6 月 June
2019, 62(6): 663 - 671
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2019.06.002

海藻糖酶基因 *TRE2-like* 和 *TRE2* 在异色瓢虫羽化过程中的表达与功能

张道伟[1], 李 燕[2], 张 萌[2], 王莎莎[2], 肖仲久[1], 曾伯平[1], 倪晓丽[2], 唐 斌[1,2,*]

(1. 遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义 563006; 2. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要:【目的】异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 是一种重要的捕食性天敌昆虫,海藻糖在异色瓢虫的变态发育、羽化等整个生命过程都起着重要的作用。本研究以前期获得的类似膜结合型海藻糖酶(TRE2-like)与膜结合型海藻糖酶(TRE2)基因为基础,探讨在异色瓢虫羽化阶段这两个海藻糖酶的潜在功能,为阐明异色瓢虫从蛹发育到成虫时海藻糖代谢机制提供参考。【方法】根据 *TRE2-like* 和 *TRE2* 基因序列设计双链 RNA(dsRNA)区域片段并合成对应的 dsRNA,通过 RNAi 将其注射到异色瓢虫 2 日龄蛹中。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 RNAi 处理后羽化第 1 天的异色瓢虫成虫糖代谢相关基因的表达;同时采用蒽酮比色法、酶标法等分别测定 RNAi 处理后羽化第 1 天的异色瓢虫成虫主要糖类物质含量及 TRE 活性变化,并观察异色瓢虫羽化后的表型变化。【结果】结果表明,与对照组(ds*GFP* 注射组)相比,异色瓢虫 2 日龄蛹被注射 *TRE2-like* 或 *TRE2* dsRNA 后,其新羽化成虫体内 *TRE2-like* 和 *TRE2* 表达量均极显著下调,且少数个体出现了蜕皮与翅形成困难等畸形表型。可溶性海藻糖酶活性在注射 ds*TRE2-like* 后显著降低,膜结合型海藻糖酶活性在注射 ds*TRE2* 后显著降低;注射 ds*TRE2* 后糖原含量显著下降,注射 ds*TRE2-like* 后糖原和海藻糖含量显著下降,注射 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后糖原和葡萄糖含量显著下降,且海藻糖含量极显著下降。注射 ds*TRE2-like*, ds*TRE2* 和 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后可溶性海藻糖酶基因 *TRE1-1* 和 *TRE1-2* 表达下降或显著下降,而 *TRE1-5* 表达上升或显著上升,海藻糖合成酶(trealose-6-phosphate synthase, TPS)、糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)、糖原合成酶(glycogen synthase, GS)基因的表达均显著下调。【结论】*TRE2-like* 和 *TRE2* 基因表达被抑制后,异色瓢虫海藻糖等代谢受到影响。研究结果为探究异色瓢虫体内膜结合型海藻糖酶的潜在功能和调控机制奠定了基础。

关键词: 异色瓢虫; 海藻糖酶; TRE2-like; TRE2; 基因表达; 酶活性; RNA 干扰

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)06-0663-09

Expression and function of trehalase genes *TRE2-like* and *TRE2* during adult eclosion in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

ZHANG Dao-Wei[1], LI Yan[2], ZHANG Meng[2], WANG Sha-Sha[2], XIAO Zhong-Jiu[1], ZENG Bo-Ping[1], NI Xiao-Li[2], TANG Bin[1,2,*] (1. Department of Life Sciences, Zunyi Normal University, Zunyi, Guizhou 563006, China; 2. College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract:【Aim】*Harmonia axyridis* is an important predatory natural enemy, and trehalose plays an important role in the whole life of *H. axyridis*, such as metamorphosis and adult eclosion. This study aims to explore the potential functions of two trehalase genes *TRE2-like* and *TRE2*, which were obtained earlier, on trehalose utilization during adult eclosion of *H. axyridis*, and to provide reference for

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672081); 贵州省科学技术基金(黔科合 JZ 字[2014]2014 号)
作者简介: 张道伟, 男, 1981 年生, 河南南阳人, 博士, 教授, 研究方向为昆虫分子生物学及害虫生物防治, E-mail: zhangdw1000@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: tbzm611@163.com
收稿日期 Received: 2018-12-17; 接受日期 Accepted: 2019-03-15

clarifying the potential mechanism of trehalose metabolism in the development from pupa to adult in *H. axyridis*. 【Methods】The dsRNAs of *TRE2-like* and *TRE*2 were synthesized by designing double-stranded RNA (dsRNA) region fragments based on the cloned gene sequences of *TRE2-like* and *TRE*2, and injected into the 2-day-old pupae of *H. axyridis* by RNAi technology. The expression levels of carbohydrate metabolism-related genes in the 1-day-old adults of *H. axyridis* after RNAi were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). At the same time, the changes in the contents of main saccharides and the trehalase activity after RNAi in its 1-day-old adults were determined by fluorenone colorimetric method and enzyme labeling method, respectively, and the phenotypic changes in eclosed adults after RNAi were observed. 【Results】The results showed that after the dsRNA of *TRE2-like* or *TRE*2 was injected into the 2-day-old pupae of *H. axyridis*, the expression levels of *TRE2-like* and *TRE*2 in its newly emerged adults were significantly decreased as compared with the control group (ds*GFP* injection group), and a few adults showed abnormal phenotypes such as difficulty in molting and wing formation. The soluble trehalase activity decreased significantly after injection of ds*TRE2-like*, while the membrane-bound trehalase activity decreased significantly after injection of ds*TRE*2. As compared with the control group, the ds*TRE*2 injection group had significantly decreased glycogen content, the ds*TRE2-like* injection group had significantly decreased glycogen and trehalose contents, and the ds*TRE2-like* plus ds*TRE*2 injection group had significantly decreased glycogen and glucose contents and extremely significantly decreased trehalose content. Meanwhile, the expression levels of soluble trehalase genes *TRE*1-1 and *TRE*1-2 in the ds*TRE2-like*, ds*TRE*2 and ds*TRE2-like* plus ds*TRE*2 injection groups decreased or significantly decreased, that of *TRE*1-5 increased or significantly increased, and those of trealose-6-phosphate synthase (TPS), glycogen phosphorylase (GP) and glycogen synthase (GS) genes were significantly decreased as compared to the control group. 【Conclusion】The metabolism of trehalose and the like in *H. axyridis* is affected after the expression of *TRE2-like* and *TRE*2 is inhibited. The results of this study lay a foundation for exploring the potential function and regulation mechanism of membrane-bound trehalases in *H. axyridis*.

Key words: *Harmonia axyridis*; trehalase; TRE2-like; TRE2; gene expression; enzyme activity; RNA interference

海藻糖(trehalose)是由两个糖苷相连的葡萄糖单位组成的一种非还原性双糖,存在于细菌、酵母菌、真菌、植物、昆虫和其他无脊椎动物等多种生物中,主要在昆虫脂肪体中合成(Frison *et al*., 2007; Tang *et al*., 2008)。海藻糖于美洲野蚕 *Antheraea polyphemus* 的蛹和沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 中被发现,是幼虫、蛹和成虫血淋巴中的主要糖分储备,在能量代谢和应对压力方面起着至关重要的作用(Ge *et al*., 2011; Xie *et al*., 2013),有"昆虫生命之糖"的美誉(于彩虹等, 2008)。1893 年在黑曲霉中发现海藻糖酶(trehalase, TRE)(唐斌等, 2018),是昆虫海藻糖代谢中必不可少的专一地将昆虫体内海藻糖水解成为葡萄糖的代谢酶,调控海藻糖水平(Shukla *et al*., 2015),并且在昆虫的大多组织中以不同形式存在(Chen *et al*., 2010; Tan *et al*., 2014)。海藻糖酶由海藻糖酶基因编码调控,以可溶性海藻糖酶(soluble trehalase, TRE1)和膜结合型海藻糖酶(membrane-bound trehalase, TRE2)(Forcella *et al*., 2010; Ma *et al*., 2015)两种形式存在于昆虫多种组织中,并且已在几种昆虫物种中进行了鉴定,如西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Lee *et al*., 2007)、大豆蚜 *Aphis glycines* (Bansal *et al*., 2013)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Zou *et al*., 2013)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Parkinson *et al*., 2003; Tang *et al*., 2016)和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Tang *et al*., 2008)。其中,最先鉴定出来的海藻糖酶是在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中所克隆的可溶性海藻糖酶(Takiguchi *et al*., 1992);膜结合型海藻糖酶(TRE2)直到 2005 年首次在家蚕 *Bombyx mori* 中被发现(Mitsumasu *et al*., 2005);是否存在跨膜域是海藻糖酶膜结合型或可溶型酶的判断标准(刘晓健等, 2016)。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis*，属鞘翅目(Coleoptera)瓢虫科(Coccinellidae)(Koch *et al.*, 2003；邬梦静等，2016)，是我国重要的天敌昆虫蚜虫及其他害虫的高效天敌(Nakayama *et al.*, 2010)。在昆虫中，TRE2 参与飞行、繁殖、发育和中肠消化等许多生理过程(Wegener *et al.*, 2010)，并且具有独特性，如具有跨膜螺旋区域和两个保守基序(DAKTFVDMK 和 LGRKM)，而 TRE1 没有假定的跨膜区域(Gu *et al.*, 2009)。*TRE2* 基因已在多种昆虫中克隆，主要在昆虫的脂肪体、中肠和马氏管中表达，如家蚕的幼虫中肠、蛹和卵巢主要含有海藻糖酶(Mitsumasu *et al.*, 2005)。有相关报道在飞蝗 *Locusta migratoria* 中发现了一类无跨膜结构，与膜结合型蛋白同源性高且聚在一支的类似膜结合型海藻糖酶(membrane-bound like trehalase，TRE2-like)，这种 TRE2-like 极有可能为可溶性海藻酶进化到膜结合型海藻糖酶的中间类型(刘晓健等，2016)，这些发现为膜结合型海藻糖酶的组织分布、表达模式和潜在功能提供了新的数据。前人对可溶性海藻糖酶的同源基因的功能研究很普遍，但是对这一类膜结合型海藻糖酶的同源基因的具体功能研究得相对较少。*TRE2-like* 和 *TRE2* 在昆虫中的相应的作用机制尚不清楚，对其结构、组织分布和表达模式也知之甚少。膜结合型海藻糖酶的两个基因的功能区分还未明确，如何相辅相成又如何各司其职，有必要进一步地洞悉探索其功能。该试验主要以探究 *TRE2-like* 和 *TRE2* 功能为切入点，利用成熟有效的 RNA 沉默调节技术，进行异色瓢虫海藻糖酶活性及其调控表达的初步研究，揭示其具体功能，探讨基因表达趋势，阐述代谢机理，为探究膜结合型海藻糖酶的功能提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

供试昆虫主要为杭州师范大学动物适应与进化重点实验室饲养的异色瓢虫，饲养在温度为 25±1℃，相对湿度为 70%±5%，光周期为 14L∶10D 的人工气候室。每日定时喂食一次豌豆修尾蚜 *A. medicaginis*，待异色瓢虫进入蛹期第 2 天，用于显微注射。

1.2　RNA 干扰

1.2.1　dsRNA 的合成：采用 Trizol 法抽提异色瓢虫蛹期的总 RNA，微量分光光度计检测后，依据 PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 模板的合成，反转录产物 cDNA 贮存至 −20℃ 备用。根据已得到的异色瓢虫 *TRE2-like*、*TRE2* 和 *GFP* 基因编码区序列设计特异性 dsRNA 合成引物(引物的 5′端添加 T7 RNA 聚合酶识别序列 5′-GGATCCTAATACGACTCACTATAGG-3′)，引物信息见表 1。高剂量的 dsRNA 具有更好的沉默靶标基因的可能性，因此，需要大量合成高浓度的 dsRNA，以保证干扰的效率。以克隆测序确认含有 *TRE2-like*、*TRE2* 和 *GFP* 基因序列的质粒 DNA 为模板，PCR 扩增 5′端带 T7 启动子的 DNA 模板。根据 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒的说明书合成 ds*TRE2-like*、ds*TRE2* 和 ds*GFP*，操作中要保证 DNase-free 和 RNase-free。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的完整性，微量分光光度计检测 dsRNA 的浓度和 OD 值，将产物质量高的 dsRNA 保存至 −20℃ 备用。

1.2.2　dsRNA 显微注射：根据预实验结果选取刚进入蛹期的异色瓢虫为试验用虫，使用微注射仪自蛹的腹部较软部位注射，通过氮气压调整 dsRNA 的体积使其泵出的体积符合注射量 dsRNA 注射量，均约为 300 ng/头。分别注射 ds*TRE2-like*、ds*TRE2*、ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 和 ds*GFP*(对照)至异色瓢虫，羽化后取样，每个处理注射异色瓢虫蛹 20～30 头，重复 3 次。

1.3　RT-qPCR 检测异色瓢虫糖代谢关键基因的相对表达水平

取 1.2 节中 RNAi 处理后羽化第 1 天的异色瓢虫成虫，提取总 RNA 合成 cDNA 作为模板(方法同 1.2 节)，利用实时荧光定量 PCR 分别检测可溶性海藻糖酶基因 *TRE*、海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase，TPS)基因、糖原合成酶(glycogen synthase，GS)基因和糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase，GP)基因在检测样品中的表达量，3 个生物学重复(每个样品得到 3 管平行 cDNA)。以 *QHa-rp49* 作为内参基因，注射 ds*GFP* 作为阴性对照。反应采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行 qPCR 扩增，每个样品设置技术重复 3 次。qPCR 反应体系(20 μL)：SYBR Green Ⅰ 10 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 6 μL。PCR 扩增条件：95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 5 s，60℃ 延伸 20 s，40 个循环。熔解曲线，95℃ 15 s，60℃ 1 min，40℃ 30 s，每次反应后绘制溶解曲线，保证无非特异性扩增。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	用途 Purpose
DSHaTRE2-like-F	CAGGTGGGAGATTCAGG	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
DSHaTRE2-like-R	TCAATGTAGGAGGCTGTG	
DSHaTRE2-F	CCCAAGGACTGGATAAG	
DSHaTRE2-R	CAATAAAGGTGGTTGAGAA	
DSHaGFP-F	CCTGAAGTTCATCTGCACCA	
DSHaGFP-R	ACAAGCAGAAGAACGGCATCA	
QHa-rp49-F	GCGATCGCTATGGAAAACTC	RT-qPCR
QHa-rp49-R	TACGATTTTGCATCAACAGT	
RTHaTRE2-like-F	TTCCAGGTGGGAGATTCAGG	
RTHaTRE2-like-R	GGGATCAATGTAGGAGGCTGTG	
RTHaTRE2-F	CAATCAGGGTGCTGTAATGTCG	
RTHaTRE2-R	CGTAGTTGGCTCATTCGTTTCC	
RTHaTRE1-1-F	CTTCGCCAGTCAAACGTCA	
RTHaTRE1-1-R	CCGTTTGGGACATTCCAGATA	
RTHaTRE1-2-F	TGACAACTTCCAACCTGGTAATG	
RTHaTRE1-2R	TTCCTTCGAGACATCTGGCTTA	
RTHaTRE1-3-F	ACAGTCCCTCAGAATCTATCGTCA	
RTHaTRE1-3-R	GGAGCCAAGTCTCAAGCTCATC	
RTHaTRE1-4-F	TTACTGCCAGTTTGATGACCATT	
RTHaTRE1-4-R	CATTTCGCTAATCAGAAGACCCT	
RTHaTRE1-5-F	TGATGATGAGGTACGACGAGAA	
RTHaTRE1-5-R	GTAGCAAGGACCTAACAAACTGC	
RTHaTPS-F	GACCCTGACGAAGCCATACC	
RTHaTPS-R	AAAGTTCCATTACACGCACCA	
RTHaGS-F	CCCTTAGGATCGGATGTTCTC	
RTHaGS-R	CACCAGCCATCTCCCAGTT	
RTHaGP-F	GCTGAAGCCCTCTACCAACT	
RTHaGP-R	CGCCGTACTCGTATCTTATGC	

1.4 RNAi 后异色瓢虫海藻糖合成代谢通路关键酶活性和糖类物质含量的测定

取 1.2 节中 RNAi 处理后羽化第 1 天的异色瓢虫成虫,测定酶活力和糖类物质含量。取样要求为 3 个生物学重复,试验要求为 3 个技术重复。样品用 PBS 研磨,超声破碎。4℃ 1 000 g 离心 20 min。取 350 μL 上清 4℃ 20 800 g 超离心 60 min;剩余上清用于蛋白浓度、糖原浓度、海藻糖浓度测定。

取 60 μL 超离心的上清,加海藻糖(40 mmol/L) 75 μL, 37℃水浴 60 min, 100℃水浴 5 min,加 300 μL 海藻糖分析试剂,37℃水浴 30 min,水浴后即刻加入 300 μL 2N H_2SO_4 终止反应,用酶标仪测 540 nm 吸光度,检测可溶性海藻糖酶活性。取 60 μL 用 PBS 制备的沉淀悬浮液,加海藻糖(40 mmol/L) 75 μL 和 PBS 165 μL, 37℃水浴 60 min, 100℃水浴 5 min,加 300 μL 海藻糖分析试剂,37℃水浴 30 min,水浴后即刻加入 300 μL 2mol/L H_2SO_4 终止反应,用酶标仪测 540 nm 吸光度,检测膜结合型海藻糖酶活性。

采用蒽酮法检测海藻糖含量,取 30 μL 1 000 g 离心的上清液,加 30 μL 1% H_2SO_4,90℃水浴 10 min,冰浴 3 min,加 30 μL 30% KOH, 90℃水浴 10 min,冰浴 3 min,加入 600 μL 显影剂(0.02 g 蒽酮 + 100 mL 80% 的 H_2SO_4), 90℃水浴 10 min,冰浴冷却,用酶标仪测 630 nm 吸光度。

糖原含量检测:取 160 μL 1 000 g 离心上清样品加入 600 μL 蒽酮硫酸试剂,90℃水浴 10 min,冰浴冷却,用酶标仪测 625 nm 吸光度。用葡萄糖检测试剂盒(购自 Sigma 公司)检测葡萄糖浓度,分别取 150 μL 20 800 g 离心的上清液,20 800 g 沉淀悬浮液至 EP 管中,向样品及葡萄糖标曲中加入 300 μL 葡萄糖分析试剂,37℃ 30 min,即刻加入 300 μL

2mol/L H_2SO_4 终止反应，用酶标仪测 540 nm 吸光度。

采用 BCA 蛋白定量试剂盒（购自 Bestbio 公司）检测蛋白浓度，即加入 200 μL BCA 工作液，37℃恒温箱放置 30 min，用酶标仪测 562 nm 吸光值。

1.5 数据分析

利用 qPCR 数据，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法（Livak and Schmittgen, 2001）分析基因相对表达量。

采用 STATISTICA 8.0 和 SigmaPlot 10.0 进行统计分析，采用 SPSS 和 one-way ANOVA 数据分析软件进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 RNAi 后异色瓢虫 *TRE2-like* 和 *TRE2* 基因的表达

在异色瓢虫蛹体内注射 ds*TRE2-like*，ds*TRE2* 及 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后，相对于注射 ds*GFP* 的对照组，其成虫体内 *TRE2-like* 和 *TRE2* 基因表达量都表现出极显著下调（$P<0.01$）（图 1：A，B），表明 RNAi 抑制效果明显。此外，与对照组比较，各处理组部分异色瓢虫在羽化为成虫时出现了蜕皮与翅形成困难等畸形表型（图 1：C）。

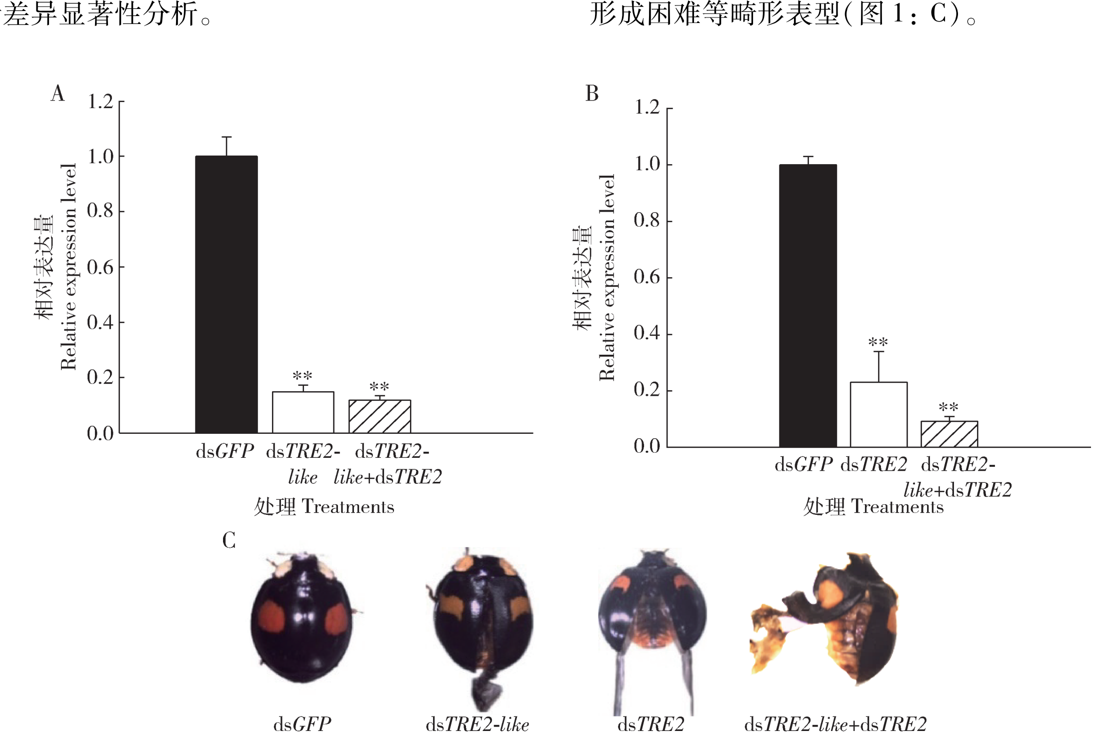


图 1 异色瓢虫 RNAi 后 *TRE2-like*（A）和 *TRE2*（B）相对表达水平及畸形（C）

Fig. 1 Relative expression levels of *TRE2-like* (A) and *TRE2* (B) and the deformity phenotypes (C) of *Harmonia axyridis* after RNAi

蛹期注射 dsRNA，测定羽化后第 1 天成虫中的基因表达水平、表型变化、以及酶活性和几种物质含量的变化。图 2–4 同。柱上双星号表示与对照组（ds*GFP* 注射组）比较在 0.01 水平上差异极显著（one-way ANOVA）。The dsRNA was injected into the pupae, and the gene expression level, phenotype change, and changes in enzyme activities and contents of several substances in 1-day-old adults were detected. The same for Figs. 2–4. The double asterisk above bars mean extremely significant difference from the control (ds*GFP* injection group) at the 0.01 level (one-way ANOVA).

2.2 RNAi 后异色瓢虫海藻糖酶活性的变化

通过 RNAi 抑制 *TRE2-like* 和 *TRE2* 基因表达后，海藻糖酶活性检测结果显示：与注射 ds*GFP* 的对照组相比，可溶性和膜结合型两类海藻糖酶活性呈下调趋势（图 2），其中注射 ds*TRE2-like* 后可溶性海藻糖酶活性显著下降（$P<0.05$）（图 2：A）；而注射 ds*TRE2* 后膜结合型海藻糖酶活性显著下降（$P<0.05$）（图 2：B）。

2.3 RNAi 后异色瓢虫体内糖原、葡萄糖和海藻糖含量的变化

与注射 ds*GFP* 的对照组相比，注射 ds*TRE2-like*，ds*TRE2* 和 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后，糖原含量均显著下降（$P<0.05$）（图 3：A）；葡萄糖含量在注射 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后显著下降（$P<0.05$）（图 3：B）；海藻糖含量在注射 ds*TRE2-like* 后显著下降（$P<0.05$），在注射 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后极显著下降（$P<0.01$）（图 3：C）。

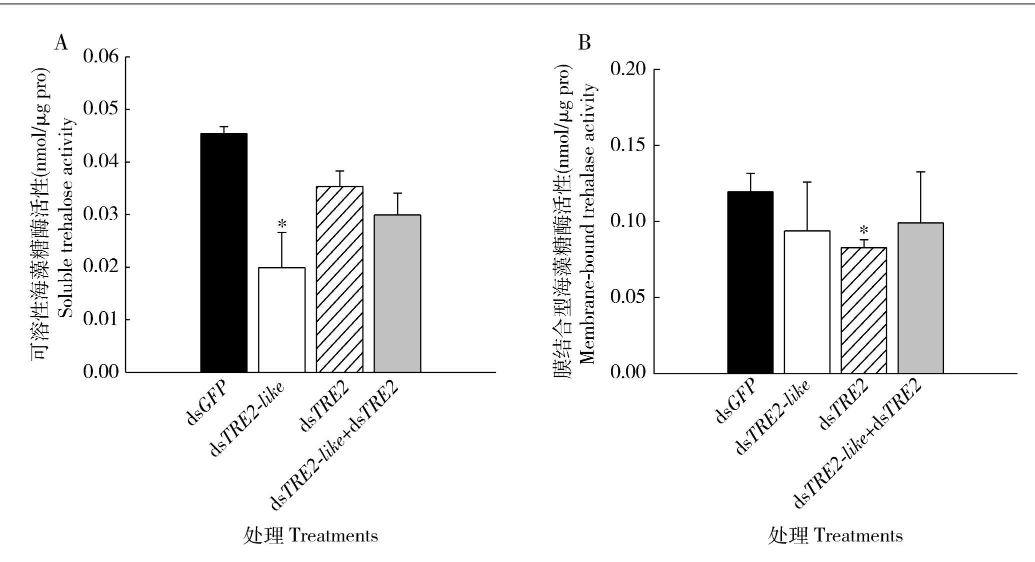


图 2 RNAi 后对异色瓢虫可溶性海藻糖酶(A)和膜结合型海藻糖酶(B)活性的影响

Fig. 2 Effect of RNAi on the activities of soluble trehalase (A) and membrane-bound trehalase (B) in *Harmonia axyridis*

柱上星号表示与对照组(ds*GFP* 注射组)比较在 0.05 水平上差异显著(one-way ANOVA)。The asterisk above bars means significant difference from the control (ds*GFP* injection group) at the 0.05 level (one-way ANOVA).

A
糖原含量(nmol glucose/μg pro)
Glycogen content
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
* * *
dsGFP
dsTRE2-like
dsTRE2
dsTRE2-like+dsTRE2
处理 Treatments

B
葡萄糖含量(nmol glucose/μg pro)
Glucose content
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
*
dsGFP
dsTRE2-like
dsTRE2
dsTRE2-like+dsTRE2
处理 Treatments

C
海藻糖含量(nmol/μg pro)
Trehalose content
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
**
dsGFP
dsTRE2-like
dsTRE2
dsTRE2-like+dsTRE2
处理 Ttreatments

图 3 RNAi 后异色瓢虫糖原(A)、葡萄糖(B)和海藻糖(C)含量的变化

Fig. 3 Changes in contents of glycogen (A), glucose (B) and trehalose (C) of *Harmonia axyridis* after RNAi

柱上单星号和双星号分别表示与对照(ds*GFP* 注射组)比较在 0.05 和 0.01 水平上差异显著和极显著(one-way ANOVA)。The single asterisk and double asterisk above bars mean significant and extremely significant difference from the control (ds*GFP* injection group) at the 0.05 and 0.01 level (one-way ANOVA), respectively.

2.4　RNAi 后可溶性海藻糖酶及海藻糖和糖原代谢相关基因表达的变化

与注射 ds*GFP* 的对照组相比较，注射 ds*TRE2-like* 后，可溶性海藻糖酶基因 *TRE*1-1 和 *TRE*1-2 表达量分别表现为下降和显著下降，而 *TRE*1-3 和 *TRE*1-4 基因表达量显著上调（$P < 0.05$）；注射 ds*TRE2* 后 *TRE*1-1，*TRE*1-2 和 *TRE*1-3 基因表达量均极显著下调（$P < 0.01$）；注射 ds*TRE2-like* + ds*TRE2* 后，*TRE*1-1 和 *TRE*1-2 基因表达量极显著下调（$P < 0.01$），*TRE*1-5 基因表达量显著上调（$P < 0.05$）（图 4：A）。此外，与对照组相比较，注射 3 种 dsRNA 后异色瓢虫体内的 *TPS*，*GP* 和 *GS* 基因的表达量均表现为显著性（$P < 0.05$）或极显著性（$P < 0.01$）下调（图 4：B）。

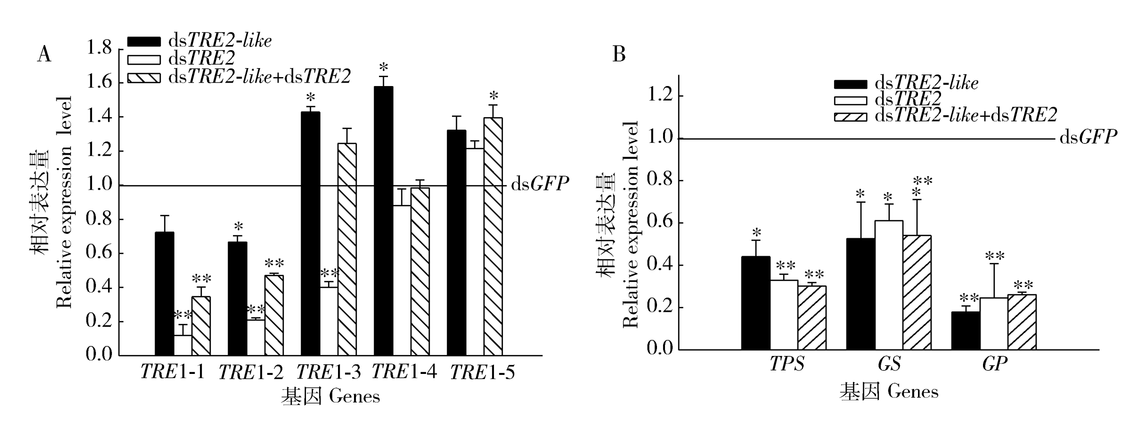


图 4　RNAi 后异色瓢虫可溶性海藻糖酶基因（A）和糖代谢相关基因（B）相对表达水平的变化

Fig. 4　Changes in relative expression levels of soluble trehalase genes（A）and carbohydrate metabolism-related genes（B）in *Harmonia axyridis* after RNAi

TRE1-1 – 5：可溶性海藻糖酶基因 Soluble trehalase gene；*TPS*：海藻糖合成酶基因 Trehalose-6-phosphate synthase gene；*GS*：糖原合成酶基因 Glycogen synthase gene；*GP*：糖原磷酸化酶基因 Glycogen phosphorylase gene. 柱上单星号和双星号分别表示某一基因的表达水平与对照（ds*GFP* 注射组）比较在 0.05 和 0.01 水平上差异显著（one-way ANOVA）。The single asterisk and double asterisk above bars mean significant difference in the expression level of a gene from the control（ds*GFP* injection group）at the 0.05 and 0.01 level，respectively（one-way ANOVA）.

3　讨论

海藻糖酶是把海藻糖水解为葡萄糖的关键酶，在昆虫各种生理过程中有着重要的作用（刘晓健等，2016）。近年来，已从多种昆虫中克隆出了可溶性海藻糖酶（TRE1）和膜结合海藻糖酶（TRE2），对其两者间的功能以及 *TRE*1 的同源基因相关分工功能已经有了深入的研究。研究发现，TRE2 为胞外酶，主要存在于微绒毛或基侧膜上，与肌肉中的线粒体结合，负责外源性海藻糖的吸收和同化，在脂肪体、中肠和马氏管中高表达（Ma *et al*.，2015）。另有相关研究发现昆虫 *TRE*2 不止一条编码基因存在，如赤拟谷盗、异色瓢虫等均存在两条或以上 *TRE*2，但对膜结合型海藻糖酶（TRE2）和类似膜结合型海藻糖酶（TRE2-like）间的功能差异了解甚少（刘晓健等，2016）。RNAi 作为一种有效的基因调控技术，在基因表达方面有不可比拟的优越性，被广泛用于基因功能研究领域（王伟伟等，2017）。Tang 等（2016）对鞘翅目中的赤拟谷盗海藻糖酶基因的功能研究表明，通过 RNAi 技术沉默赤拟谷盗海藻糖酶基因来调节基因表达可导致其蜕皮畸形与死亡。本研究显示注射靶标 dsRNA 后均能够有效地抑制靶标基因 *TRE2-like* 和 *TRE*2 的表达，羽化时 *TRE2-like* 和 *TRE*2 基因的表达均呈显著性或极显著性下调（图 1）。

前人研究发现膜结合海藻糖酶 TRE2 的持续表达和活性对于血淋巴海藻糖的代谢可能是必要的，以满足中肠细胞的能量需求（Tatun *et al*.，2008）。已有研究表明通过酶活性测定证实 *TRE*2 在蛹到成虫变态过程中的作用更明显（Ge *et al*.，2011）。海藻糖和海藻糖酶活性在调节昆虫多种生理过程中起着关键作用（Ge *et al*.，2011），昆虫的海藻糖可为昆虫提供稳定的葡萄糖作为能量来源，这在昆虫生理过程中的作用已经得到了很好的证明（Santos *et al*.，2012），且在调节昆虫生长发育、蜕皮过程中几丁质的合成、迁飞、耐寒等生理活动中均发挥着重要的作用（Chen *et al*.，2010）。在本研究中，我们进一步检测了可溶性海藻糖酶和膜结合性海藻糖酶的活性水平，结果发现注射 ds*TRE2-like* 后可溶性海藻糖酶活

性显著下调(图 2：A)；注射 ds*TRE*2 后膜结合型海藻糖酶活性呈显著下调(图 2：B)。

海藻糖酶在形成代谢和糖酵解之间的联系方面发挥着基础性作用。作为昆虫的主要血糖，*TRE* 基因可以通过调控基因表达和酶活性来影响 3 种糖类物质含量(Wegener *et al*., 2010；Santos *et al*., 2012；Shi *et al*., 2017)。海藻糖和糖原是昆虫重要的能量贮存物质，同时在昆虫的能量代谢中起重要的作用(Tan *et al*., 2014)。相关报道表明，当海藻糖酶水解葡萄糖受到抑制后，会影响昆虫体内的各种细胞供能和血糖浓度，从而影响其他生理途径。已有研究表明干扰 *TRE*2 后，甜菜夜蛾体内海藻糖含量升高，葡萄糖含量下降(Chen *et al*., 2010)。在本试验中检测了 *TRE2-like* 和 *TRE*2 基因 RNAi 后异色瓢虫体内相关糖含量的变化，糖原和葡萄糖含量下降表明 *TRE2-like* 和 *TRE*2 能够调控海藻糖代谢，从而影响糖原和葡萄糖的合成，且海藻糖和糖原的合成变得更加活跃，以积累足够的能源储备供蛹阶段发育的使用(Ma *et al*., 2015)。海藻糖含量呈现下降趋势(图 3：C)，可能是为了完成羽化，海藻糖被过度地水解为葡萄糖，为正常羽化提供能量所造成的；同时降低 *TPS* 基因和部分 *TRE* 基因的表达(图 4：A，B)，甚至降低了海藻糖酶活性(图 2)，用于维持蛹期的糖代谢。正如本研究中所示，异色瓢虫 *TRE2-like* 和 *TRE*2 基因 RNAi 后，*TRE2-like* 和 *TRE*2 表达下调且异色瓢虫羽化后出现畸形现象(图 1：C)，这与干扰赤拟谷盗、褐飞虱等昆虫的 *TRE* 基因后出现的表型(Tang *et al*., 2016；张露等，2017)相一致。表明 RNAi 造成的表型畸形是在蛹的阶段严重缺乏海藻糖，从而抑制下游几丁质合成通路所引起的。

相关研究表明，不同的 *TRE*1 分工有细微的不同，赤拟谷盗 5 个 *TRE*1 调控功能均有所差异(Tang *et al*., 2016)。随后，本研究 RNAi 实验结果表明，干扰 *TRE2-like* 和 *TRE*2 对 *TRE*1-1 和 *TRE*1-2 影响较大，对 *TRE*1-4 和 *TRE*1-5 影响较小，而干扰 *TRE*2 对 *TRE*1-3 的影响较大。从而发现分属于不同组的 *TRE*1 具有不同的生物学功能，在本研究中，RNAi 抑制膜结合型海藻糖酶基因表达后，结果显示糖代谢相关基因 *TPS* 和 *GS* 表现为显著性下调，*GP* 表现为极显著性下调(图 4：B)。因此推测 *TRE2-like* 和 *TRE*2 可能与异色瓢虫新表皮几丁质合成需要大量海藻糖有关。海藻糖是昆虫血淋巴中的主要糖类物质，在昆虫生长、发育、蜕皮等正常生理活动中是不可或缺的，故而被称为昆虫的“血糖”(Yang *et al*., 2017)。几丁质为昆虫表皮、中肠围食膜和气管系统的主要组成成分。干扰 *TRE2-like* 和 *TRE*2 基因对异色瓢虫的生长发育产生了较大影响并产生了死亡及蜕皮障碍，降低了 *GS* 和 *GP* 的表达量，从而影响糖原及其他糖类物质的合成，推测抑制 *TRE2-like* 和 *TRE*2 表达后能够下调胰岛素通路中的相关基因表达，从而调控海藻糖等糖类物质代谢。

RNAi 能够有效降低靶标基因的表达；ds*TRE2-like* 和 ds*TRE*2 注射到异色瓢虫蛹，能够打破体内海藻糖代谢，并影响糖原和葡萄糖的供应，进一步引起几丁质合成困难，导致羽化畸形。

参考文献（References）

Bansal R, Mian AF, Mittaoalli O, Michel AP, 2013. Molecular characterization and expression analysis of soluble trehalase gene in *Aphis glycines*, a migratory pest of soybean. *Bull. Entomol. Res.*, 103：286－295.

Chen J, Tang B, Chen HX, Yao Q, Huang XF, Chen J, Zhang D, Zhang W, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5(4)：e10133.

Forcella M, Cardona F, Goti A, Parmeggiani C, Cipolla L, Gregori M, Schirone R, Fusi P, Parenti P, 2010. A membrane-bound trehalase from *Chironumus riparius* larvae：purification and sensitivity to inhibition. *Gycobiology*, 20(9)：1186－1195.

Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, François J, Chaumont F, Batoko H, 2007. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Lett.*, 581(21)：4010－4016.

Ge LQ, Zhao KF, Huang LJ, Wu JC, 2011. The effects of triazophos on the trehalose content, trehalase activity and their gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera：Delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(2)：172－181.

Gu J, Shao Y, Zhang C, Liu Z, Zhang Y, 2009. Characterization of putative soluble and membrane-bound trehalases in hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 55(11)：997－1002.

Koch RL, 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*：a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.*, 3(1)：32.

Lee JH, Saito S, Mori H, Nishimoto M, Kim D, Wongchawalit J, Kimura A, Chiba S, 2007. Molecular cloning of cDNA for trehalase from the European honeybee, *Apis mellifera* L., and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(9)：2256－2265.

Liu XJ, Sun YW, Cui M, Ma EB, Zhang JZ, 2016. Molecular characteristics and functional analysis of trehalase genes in *Locusta migratoria*. *Sci. Agric. Sin.*, 49(22)：4375－4386. [刘晓健，孙亚文，崔淼，马恩波，张建珍，2016. 飞蝗海藻糖酶基因的分子特性及功能. 中国农业科学，49(22)：4375－4386]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Ma L, Dai W, Li X, Zhang Y, Zhang C, 2015. Molecular cloning and expression analysis of soluble and membrane-bound trehalase genes in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 18(2): 187–195.

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 501–508.

Nakayama S, Seko T, Takatsuki JI, Kazuki, Miura K, Miyatake T, 2010. Walking activity of flightless *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a biological control agent. *J. Econ. Entomol.*, 103(5): 1564–1568.

Parkinson NM, Conyers CM, Keen JN, MacNicoll AD, Smith I, Weaver RJ, 2003. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 134(4): 513–520.

Santos R, Alves-Bezerra M, Rosas-Oliveira R, Majerowicz D, Meyer-Fernandes JR, Gondim KC, 2012. Gene identification and enzymatic properties of a membrane-bound trehalase from the ovary of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 81(4): 199–213.

Shi ZK, Wang S, Wang SG, Zhang L, Xu YX, Guo XJ, Zhang F, Tang B, 2017. Effects of starvation on the carbohydrate metabolism in *Harmonia axyridis* (Pallas). *Biol. Open*, 6(7): 1096–1103.

Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM, 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, 25(4): 357–367.

Takiguchi M, Niimi T, Su Z H, Yaginuma T, 1992. Trehalase from male accessory-gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *Biochem. J.*, 288(Pt 1): 19–22.

Tan YA, Xiao LB, Sun Y, Zhao J, Bai LX, 2014. Sublethal effects of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, in the cotton mirid bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 111: 43–50.

Tang B, Chen X, Liu Y, Tian H, Liu J, Hu J, Xu W, Zhang W, 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. *BMC Mol. Biol.*, 9(1): 51.

Tang B, Wei P, Zhao LN, Shi ZK, Shen QD, Yang MM, Xie GQ, Wang SG, 2016. Knockdown of five trehalase genes using RNA interference regulates the gene expression of the chitin biosynthesis pathways in *Tribolium castaneum*. *BMC Biotechnol.*, 16(1): 67.

Tang B, Zhang L, Xiong XP, Wang HJ, Wang SG, 2018. Advances in trehalose metabolism and its regulation of insect chitin synthesis. *Sci. Agric. Sin.*, 51(4): 697–707. [唐斌，张露，熊旭萍，汪慧娟，王世贵，2018. 海藻糖代谢及其调控昆虫几丁质合成研究进展. 中国农业科学，51(4): 697–707]

Tatun N, Singtripop T, Tungjitwitayakul J, Sakurai S, 2008. Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(8): 788–795.

Wang WW, Liu N, Lu Q, Ling XF, Chen H, 2017. Latest research progress on RNA interference technology. *Biotechnol. Bull.*, 33(11): 35–40. [王伟伟，刘妮，陆沁，凌晓霏，陈航，2017. RNAi 技术的最新研究进展. 生物技术通报，33(11): 35–40]

Wegener G, Macho C, Schlöder P, Kamp G, Ando O, 2010. Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle. *J. Exp. Biol.*, 213(2): 3852–3857.

Wu MJ, Xu QY, Liu Y, Shi XR, Shen QD, Yang MM, Wang SG, Tang B, 2016. The super cooling point change of *Harmonia axyridis* under low temperature stress and its cold-resistance genes' expression analysis. *Sci. Agric. Sin.*, 49(4): 677–685. [邬梦静，徐青叶，刘雅，施兴荣，沈祺达，杨萌萌，王世贵，唐斌，2016. 异色瓢虫低温胁迫下过冷却点变化及抗寒基因表达分析. 中国农业科学，49(4): 677–685]

Xie YF, Yang WJ, Dou W, Wang JJ, 2013. Characterization of the cDNA encoding membrane-bound trehalase trehalase, its expression and enzyme activity in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.*, 96(4): 1233–1242.

Yang MM, Zhao LN, Shen QD, Xie GQ, Wang SG, Tang B, 2017. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Manag. Sci.*, 73(1): 206–216.

Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trealose – the blood sugar in insects. *Chin. Bull. Entomol.*, 45(5): 832–837. [于彩虹，卢丹，林荣华，王晓军，姜辉，赵飞，2008. 海藻糖——昆虫的血糖. 昆虫知识，45(5): 832–837]

Zhang L, Zhu SC, Zheng H, Shen QD, Wang SG, Tang B, 2017. Regulatory function of trehalase genes on chitin metabolism in the cuticle of *Nilaparvata lugens*. *Sci. Agric. Sin.*, 50(6): 1047–1056. [张露，朱世城，郑好，沈祺达，王世贵，唐斌，2017. 褐飞虱海藻糖酶基因在表皮几丁质代谢中的调控作用. 中国农业科学，50(6): 1047–1056]

Zou Q, Wei P, Xu Q, Zheng HZ, Tang B, Wang SG, 2013. cDNA cloning and characterization of two trehalases from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Genet. Mol. Res.*, 12(2): 901–915.

（责任编辑：马丽萍）